ALPHADIA S.A. / N.V.
DIAGNOSTIC PRODUCTS

CE IVD 24 2°C 8°C

Biermer Atrophic Gastritis DOT

Pour Instrument BlueDiver

Code:AD BAGDBD

BlueDiver Protocol: 02

1. INDICATIONS D'UTILISATION

La trousse ALPHADIA Biermer Atrophic Gastritis DOT pour Instrument BlueDiver contient 24 tests Immunodot permettant la détection des auto-anticorps IgG dirigés contre les antigènes Intrinsic Factor et PCA dans le sérum humain. Cette trousse est automatisée au moyen du *BlueDiver Instrument*.

Plus d'informations sur le type/la source des antigènes sont disponibles par l'intermédiaire de votre distributeur .

2. PRINCIPE DU TEST

Cette trousse est prévue pour une utilisation sur l'automate *BlueDiver Instrument*. Le test est basé sur une méthode immuno-enzymatique. Les bandelettes sont composées d'une membrane fixée sur un support plastique spécifique. Durant l'automatisation du test, le *BlueDiver Instrument* incube les bandelettes successivement dans les puits des cartouches contenant les réactifs prêts à l'emploi. En résumé : les bandelettes sont d'abord incubées avec le sérum dilué du patient. Les anticorps, s'ils sont présents dans l'échantillon, se lient à l'antigène/aux antigènes spécifique(s) sur la membrane. La fraction non liée est éliminée par lavage dans l'étape suivante. Ensuite les bandelettes sont incubées avec les immunoglobulines anti-IgG humaines conjuguées à de la phosphatase alcaline. Le conjugué se lie aux complexes antigènes-anticorps à la surface de la membrane. Après une étape de lavage permettant d'éliminer l'excès de conjugué, les bandelettes sont incubées dans une solution de chromogène/substrat ; celle-ci provoque l'apparition d'un produit insoluble coloré (violet) qui précipite sur le site de la réaction enzymatique. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

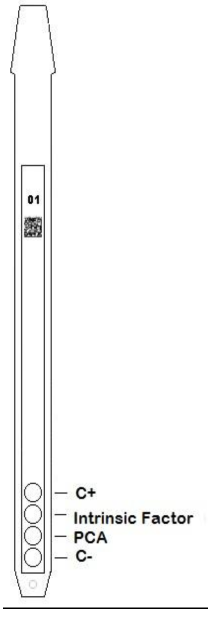
3. CONTENU DE LA TROUSSE

Abréviations en ordre alphabétique:

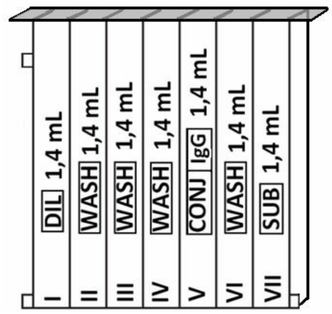
AP = Phosphatase alcaline; BCIP = Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate; BSA = albumine de sérum bovin; KCl = Chlorure de potassium; $MgCl_2$ = Chlorure de magnésium; MIT = MethylIsoThiazolone; NaCl = Chlorure de sodium; NaN_3: Sodium azide; NBT = NitroBlue Tetrazolium; TBS = Tampon Tris Salin.

Bandelettes	3 x 8 unités dans un porte-bandelettes, sécables individuellement, scellées dans une pochette en aluminium 4 dots sur chaque bandelette: 1 contrôle positif (C+) 2 antigènes 1 contrôle négatif (C-)
Cartouche	24 unités ayant chacune 7 puits:
Diluent pour échantillon	Position I, 1 x 1,4 ml (jaune) *contenu* *H_2O A TBS A NaCl A Tween A conservateur (MIT) A colorant A émulsion anti-mousse*
Tampon de lavage	Position II, III, IV et VI, 4 x 1,4 ml (incolore) *contenu* *H_2O A TBS A NaCl A Tween A conservateur (MIT) A émulsion anti-mousse*
Conjugué	Position V, 1 x 1,4 ml (rouge) *contenu* *H_2O A TBS A NaCl A KCl A $MgCL_2$ A immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines/AP A conservateur (MIT) A colorant A émulsion anti-mousse*
Substrat	Position VII, 1 x 1,4 ml (solution jaune pâle) *contenu* *H_2O A NaN_3 (0.05 %) A $MgCL_2$ A TBS A stabilisateur NBT A NBT A BCIP A émulsion anti-mousse*
Autre matériel	Papier absorbant (pour sécher les cupules au bout des porte-bandelettes, cf 8.1.16, scellé avec les bandelettes dans la pochette
Documents	Manuel d'Utilisation, Certificat d'Analyse, liste des antigènes

BANDELETTE



CARTOUCHE



4. MATERIEL OBLIGATOIRE/ NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

BlueDiver Instrument, Micropipettes, gants

5. CONSERVATION

La trousse doit être conservée à une température entre +2°C à +8°C pendant toute sa période de validité (voir date d'expiration sur la trousse). Ne pas congeler.

Après ouverture de la trousse, les cartouches de réactifs non utilisées doivent être conservées entre +2°C à +8°C et à l'abri de la lumière, de préférence dans la boîte originale de la trousse.

Les bandelettes non utilisées doivent être conservées dans les pochettes en aluminium, scellées et conservées entre +2°C à +8°C, de préférence dans la boîte originale de la trousse.

Lorsqu'ils sont conservés correctement, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée.

6. PRECAUTIONS

Tous les réactifs sont destinés au diagnostic in vitro et à une utilisation professionnelle. La trousse ne peut être utilisée que par des techniciens formés. La trousse contient des composants potentiellement dangereux, donc tout contact avec la peau, les yeux ou les muqueuses doit être évité. Les échantillons des patients doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des maladies infectieuses.

Déchets : les échantillons des patients et les bandelettes incubées doivent être manipulées comme des déchets infectieux ; les autres réactifs ne nécessitent pas une collecte séparée à moins que des directives officielles le spécifient autrement.

ALPHADIA sa/nv et ses distributeurs autorisés ne peuvent être tenus responsables en cas de dommages directs ou indirects suite à un changement ou une modification de la procédure décrite. Dans tous les cas, les BPL doivent s'appliquer à l'utilisation de cette trousse avec toutes les règles générales ou individuelles en vigueur.

7. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS, MANIPULATION ET CONSERVATION

Le test doit être utilisé de préférence sur des échantillons récemment prélevés. Les sérums présentant des particules devraient être centrifugés à faible vitesse. Les échantillons de sang doivent être recueillis dans des tubes secs ou dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine. Après séparation, les échantillons sériques doivent être utilisés immédiatement ou aliquotés et conservés à 2-8°C pendant quelques jours ou congelés à –20°C pour de plus longues périodes. Eviter les cycles répétés de congélation/décongélation des échantillons.

8. PROCEDURE DU TEST

INDICATIONS PRELIMINAIRES, MANIPULATION ET CONSEILS:

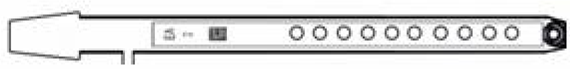
Principe de la procédure du test:

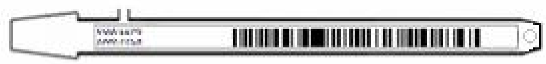
Après l'insertion manuelle des bandelettes et des cartouches de réactifs, le *BlueDiver Instrument* réalise automatiquement les incubations et les étapes de lavage. Par son mouvement continu, l'automate *BlueDiver Instrument* assure une circulation efficace des réactifs prêts à l'emploi sur la bandelette. Toute la procédure du test doit être effectuée à température ambiante.

Description des BANDELETTES:

La face réactive (avant) des bandelettes contient les antigènes qui apparaissent sous forme de dots légèrement colorés en bleu. Cette coloration garantit que tous les antigènes ont été correctement adsorbés sur la membrane. Elle disparaît pendant la première étape de la procédure. La face avant affiche également un numéro de bandelette et un code à barres à deux dimensions permettant la traçabilité des bandelettes une fois sorties du *BlueDiver Instrument* à la fin du test.

La face non-réactive (arrière) des bandelettes contient à la fois un code alphanumérique et un code à barres permettant l'identification par le *BlueDiver Instrument* du type de bandelette et du numéro de lot du test.





Les bandelettes doivent être insérées manuellement dans le peigne prévu à cet effet avant de démarrer le test automatisé (cf. Préparation du test, pt 8.1.4). Durant cette opération, veiller à ne pas toucher directement avec les doigts les membranes de nitrocellulose. Veiller à porter des gants de laboratoire et à manipuler les bandelettes par leur support en plastique (porte bandelettes).

***Description des CARTOUCHES DE REACTIFS:* (cf. image page 1)**

Les cartouches de réactifs sont composées de 7 puits différents remplis de réactifs prêts à l'emploi. Les cartouches sont scellées (et les réactifs hermétiquement séparés) au moyen d'un film d'aluminium qui doit être enlevé avant de démarrer le test. Une fois ouverte, veiller à manipuler les cartouches avec précaution de manière à éviter la perte de réactifs ou une contamination entre les puits.

La face arrière des cartouches est étiquetée au moyen d'un code alphanumérique et d'un code à barres qui permet l'identification par le *BlueDiver Instrument* du type de cartouche ainsi que du numéro de lot de celle-ci.

Les cartouches doivent être chargées manuellement dans le porte cartouches prévu à cet effet avant de démarrer le test automatisé (cf. pt 8.1.10). La face avant présente à sa base une forme triangulaire, et la face arrière présente à sa base et au sommet une forme carrée. Ces formes sont utilisées pour sécuriser l'insertion des cartouches et comme leur orientation dans le porte-cartouches.

Association BANDELETTES/CARTOUCHES

Les bandelettes et les cartouches d'une même trousse partagent le même numéro de lot et doivent être utilisées ensemble. Veiller à ne pas dissocier les composants d'une trousse ou d'associer d'une manière erronée ceux-ci car le *BlueDiver Instrument* le détectera comme une configuration invalide et arrêtera le test.

Pour autant que toutes les paires bandelettes/cartouches soient valides, le *BlueDiver Instrument* peut tester différents types de trousses en même temps. Par contre, seulement les trousses ayant le même numéro de protocole (et donc le même temps d'incubation et de séquences) peuvent être automatisées simultanément (cf. le numéro de protocole indiqué page 1, sous la référence de la trousse).

8.1 Préparation du test

- Amener tous les réactifs à température ambiante (+18°C to +25°C) avant utilisation.
- Une liste de travail (soit éditée par le logiciel Dr DOT, soit une liste externe) pourrait faciliter le chargement correct des bandelettes, cartouches et sérums de patients.
- Vérifier que le porte-cartouches est bien fixé dans son emplacement dans le *BlueDiver Instrument*.
- Vérifier que le *BlueDiver Instrument* est branché.

La liste des étapes ci-dessous résume le chargement et la préparation du *BlueDiver Instrument*, des bandelettes, des cartouches et des sérums de patients avant le début du test. Consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument* pour des informations plus détaillées en cas de problème.

1. Allumer le *BlueDiver Instrument* et attendre quelques secondes jusqu'à ce que la date et l'heure s'affichent sur l'écran tactile.
2. Confirmer la date et l'heure en appuyant sur ✔ à l'écran tactile (en cas de première utilisation ou lors d'un reset, consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*) Ÿ "Initialiser?" est affiché à l'écran.
3. Confirmer l'initialisation en appuyant sur ✔ Ÿ le bras horizontal de l'automate se place automatiquement en position centrale Ÿ "Charger bandelettes (24") est affiché.
4. <u>(Veiller à ne pas confirmer le nombre de bandelettes directement).</u> Enlever le peigne de son emplacement sur le bras horizontal en le soulevant doucement. Insérer les bandelettes à tester : tenir le peigne face numérotée vers le haut (position ouverte) et insérer les bandelettes, également face numérotée (réactive) vers le haut, en introduisant la partie supérieure des porte-bandelettes (langue) dans l'espace prévu à cet effet du peigne. Vérifier la bonne insertion en appliquant une légère pression sur le porte-bandelettes.

   Notes:
   - Charger toujours à partir de la position 1 du peigne (côté gauche) et ne pas laisser d'espace vide entre les bandelettes.
   - Lorsque toutes les bandelettes sont chargées, vérifier visuellement l'alignement vertical, horizontal et latéral des bandelettes. Tout mauvais alignement doit être corrigé en sortant les bandelettes du peigne et en les insérant à nouveau.
   - Des résidus plastiques peuvent se former lors de la séparation des bandelettes et provoquer des décalages sur le peigne; pouréviter des problèmes lors de la réalisation des tests sur le BDI ou lors de la lecture avec le logiciel Dr DOT, ceux-ci doivent être éliminés avec une simple paire de ciseaux.

5. Replacer le peigne dans son emplacement sur le bras vertical du *BlueDiver Instrument* en poussant légèrement vers le bas.

6. Sélectionner le nombre de bandelettes chargées sur le peigne en utilisant les flèches haut et bas sur l'écran tactile.
7. Confirmer le nombre de bandelettes chargées en appuyant sur ✔ Ÿ le bras horizontal se déplace alors automatiquement vers l'arrière de la machine et se positionne au-dessus des trous de référence du porte-cartouches Ÿ "Vérifier alignement" est affiché à l'écran.
8. Utiliser la fonction "Pas à Pas" pour vérifier l'alignement correct des bandelettes: maintenir une légère pression sur la flèche (bas) jusqu'à ce que les porte-bandelettes entrent dans les trous de référence. Si l'alignement est correct, les bandelettes ne touchent pas le bord des trous de référence.
   Note: en cas de mauvais alignement (contact des bandelettes avec le porte-cartouches), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
9. Confirmer le bon alignement des bandelettes en appuyant sur ✔ Ÿ le *BlueDiver Instrument* descend les bandelettes complètement dans les trous de référence et commence la lecture des codes à barres des bandelettes Ÿ une fois la lecture des codes à barres terminée, l'écran affiche "Insérer les cartouches".
   Note: si un ou plusieurs codes à barres des bandelettes n'est pas lu (LED clignotantes aux positions non-lues), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
10. Ouvrir les cartouches de réactifs et les insérer, sous leur bandelette respective, dans l'encoche prévue à cet effet du porte-cartouches.
11. Confirmer l'insertion des cartouches en appuyant sur ✔ Ÿ le *BlueDiver Instrument* procède à la lecture des codes à barres des cartouches et vérifie la bonne association avec les bandelettes Ÿ une fois la lecture des codes à barres terminée, le nombre de bandelettes (associations bandelettes/cartouches validées) est affiché.
   Note: dans le cas où un ou plusieurs codes à barres de cartouche sont illisibles, ou dans le cas d'une mauvaise association bandelette/cartouche (LED clignotantes aux positions correspondantes), consulter le Manuel Utilisateur du *BlueDiver Instrument*.
12. Confirmer le nombre de bandelettes en appuyant sur ✔ Ÿ le numéro de protocole identifié sur les codes à barres est affiché à l'écran (ID protocole : xx.).
13. Confirmer le numéro de protocole en appuyant sur ✔ Ÿ "Fermer le capot svp" est affiché à l'écran.
14. Fermer le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer la fermeture en appuyant sur✔Ÿ le *BlueDiver Instrument* réalise un premier lavage (prétraitement) en incubant les bandelettes dans le 2ème puits des cartouches (Etape de lavage: 1 minute) Ÿ A la fin de cette étape, l'écran affiche "Ouvrir le capot svp".
15. Ouvrir le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer l'ouverture en appuyant sur ✔ Ÿ le bras horizontal se déplace alors automatiquement vers l'avant de la machine et présente les bandelettes à l'utilisateur Ÿ l'écran affiche "Sécher les bandelettes".
16. Sécher les bandelettes en appuyant doucement le papier absorbant à la base des porte-bandelettes, au niveau de la petite cupule servant à charger l'échantillon.
17. Confirmer le séchage des bandelettes en appuyant sur✔ Ÿ l'écran affiche "Déposer les échantillons".
18. Déposer les échantillons en insérant 10 µl de sérum/plasma de patient dans la petite cupule à la base des porte-bandelettes.
    Note :
    Alternativement, les 10µl de sérum peuvent être déposés directement dans le diluent (1er puits de la cartouche). Cette intervention peut être réalisée à n'importe quel moment après l' ouverture de la cartouche (voir point 8.1.10).
19. Confirmer l'ajout des échantillons en appuyant sur✔ Ÿ "Fermer le capot svp" est affiché à l'écran.
20. Fermer le capot du *BlueDiver Instrument* et confirmer la fermeture en appuyant sur ✔Ÿ le *BlueDiver Instrument* démarre automatiquement le test en suivant les étapes décrites ci-dessous (**Protocole 02**):

8.2 Réalisation du test

Etape	**Description**	**Temps**
01.	Les bandelettes sont incubées dans le 1er puits de la cartouche (*Diluent pour échantillon)*. Une fois en contact avec le diluent, l'échantillon préalablement déposé (cf. 9.1.18) est libéré de la petite cavité et dilué grâce à l'agitation.	30 min
02.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 2ème puits (*Tampon de lavage).*	2 min
03.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 3ème puits (*Tampon de lavage).*	2 min
04.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 6ème puits (*Tampon de lavage*).	2 min
05.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 5ème puits (*Conjugué).*	10 min
06.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 4ème puits (*Tampon de lavage*).	2 min
07.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 3ème puits (*Tampon de lavage).*	2 min
08.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 2ème puits (*Tampon de lavage).*	2 min
09.	Le peigne se déplace vers l'avant et les bandelettes sont incubées dans le 7ème puits (*Substrat*)	10 min
10.	Le peigne se déplace vers l'arrière et les bandelettes sont incubées dans le 6ème puits (*Tampon de lavage).*	2 min

Une fois le test terminé, le peigne se déplace en position centrale pour faciliter la manipulation du peigne. L'automate émet un beep et l'écran affiche "Test fini".
Sécher les bandelettes en appuyant doucement le papier absorbant à la base des porte bandelettes, au niveau de la petite cavité servant à charger l'échantillon et laisser les bandelettes sécher pendant 30 minutes avant d'interpréter les résultats.
En cas d'utilisation du BlueScan et du Dr DOT, laisser les bandelettes révélées, attachées sur le peigne.
ENREGISTREMENT DES DONNEES DU TEST
Le protocole du test peut être téléchargé en appuyant sur le symbole de la clé USB et en suivant les indications à l'écran (Insérer clé USB Ÿ Ecriture clé USB Ÿ Enlever clé USB). Cette étape n'est pas obligatoire, mais fortement recommandée pour établir la traçabilité et répondre à certaines exigences réglementaires.

9. INTERPRETATION DES RESULTATS

Une interprétation visuelle des résultats est possible, cependant l'utilisation du logiciel Dr DOT et du BlueScan est généralement recommandée pour plus de précision et pour une interprétation semi-quantitative.
Pour plus d'informations sur le logiciel Dr DOT, contacter le distributeur.

9.1 Interprétation:

1. Enlever le peigne de l'automate *BlueDiver Instrument* et enlever les porte bandelettes du peigne.
2. Déposer les porte-bandelettes avec la face réactive des bandelettes vers le haut sur la feuille d'interprétation fournie avec la trousse. Cette feuille d'interprétation permet de déterminer la position des différents contrôles et des antigènes sur la bandelette.
3. Le dot supérieur (Contrôle positif) doit toujours être positif (coloré) pour tous les échantillons. La coloration de ce contrôle positif garantit que le test a été réalisé correctement et que les composants de la trousse ne sont pas dégradés.

4. Comparer les dots antigènes avec le contrôle négatif toujours situé en dernière position.
L'intensité de la couleur des dots antigènes est directement proportionnelle à la concentration de l'anticorps spécifique dans l'échantillon du patient. Dans des conditions optimales, et si l'échantillon est dépourvu de substances interférentes, le contrôle négatif est presque incolore. Au contraire, un contrôle négatif plus coloré indique un taux important de liaisons non spécifiques dans l'échantillon.

RESULTAT POSITIF :
Un échantillon est positif pour un anticorps spécifique si l'intensité de la couleur du dot antigène correspondant est supérieure à l'intensité de la couleur du dot Contrôle Négatif.

RESULTAT NEGATIF :
Un échantillon est négatif pour un anticorps spécifique si l'intensité de la couleur du dot antigène correspondant est inférieure ou égale à l'intensité de la couleur du dot Contrôle Négatif.
Note: Une interprétation visuelle peut être difficile pour les dots antigènes dont l'intensité de coloration est très faible et très proche de l'intensité du Contrôle Négatif. Dans de tels cas, l'utilisation du système Dr DOT/BlueScan peut être avantageuse (voir 9.2) et permettre une interprétation plus précise

9.2 Utilisation du logiciel Dr DOT et du BlueScan

1. Enlever le peigne du *BlueDiver Instrument* et laisser les porte-bandelettes contenant les bandelettes attachés au peigne.
2. Insérer le peigne dans l'emplacement prévu à cet effet dans le capot du scanner BlueScan. Veiller à introduire le peigne de telle manière que la face réactive des bandelettes soit sur la vitre du scanner.
3. Démarrer la numérisation des bandelettes au moyen du logiciel Dr DOT.
Pour plus d'informations concernant le logiciel Dr DOT et le BlueScan, se référer au Manuel Utilisateur du logiciel Dr DOT.

Unités arbitraires Dr DOT (AU)	Interprétation
< 5	négatif
5 – 10	équivoque (*)
>10	positif

** Des faibles concentrations d'auto-anticorps peuvent être observées chez des patients sains. Pour cette raison, un résultat positif faible (entre 5 et 10 UA), bien que valide, doit être considéré comme équivoque. Dans un tel cas, il est recommandé de réaliser un nouveau test du patient, de préférence en utilisant un nouvel échantillon. Si le résultat reste équivoque après ce nouveau test, d'autres tests de diagnostic et / ou clinique doivent être utilisés pour aider à déterminer le statut auto-immun du patient.*

10. PERFORMANCES

10.1 Reproductibilité

Des échantillons de référence ont été testés pour chaque anticorps dans des séries successives statistiquement représentatives tant dans un même essai ou lors de différents essais afin de calculer respectivement la variation intra et inter-essais. Dans tous les cas, les variations d'intensité de coloration des dots se trouvaient dans les limites attendues et l'écart type était inférieur à 10 %. *Les données détaillées sont disponibles sur demande.*

10.2 Sensibilité et spécificité

Des échantillons de référence caractérisés (échantillons confirmés positifs ou négatifs pour certains anticorps spécifiques et ce par des laboratoires de référence et/ou des méthodes de référence) ont été testés en suivant les instructions du test.
La sensibilité et la spécificité ont été calculées à partir des résultats générés par le logiciel Dr DOT.

IF

	+	-
+	vrai positif 56	faux positif 1
-	faux négatif 0	vrai négatif 81

Sensibilité 100%
Spécificité 99%

PCA

	+	-
+	vrai positif 35	faux positif 0
-	faux négatif 1	vrai négatif 37

Sensibilité 97%
Spécificité 100%

11. LIMITES DU TEST

1. Le diagnostic ne doit pas être établi uniquement sur base d'une seule méthode de test.
2. Les résultats doivent être toujours interprétés en tenant compte de l'examen clinique, de l'historique du patient et des résultats obtenus au moyen d'autres méthodes. Aucune technique utilisée seule ne peut écarter la possibilité de résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Dans cette optique, un test d'immunofluorescence indirecte devrait, dans la mesure du possible, être réalisé en parallèle à la détermination des auto-anticorps faite avec les trousses ALPHADIA Dot pour BDI. L'immunofluorescence étant reconnue comme méthode de référence en auto-immunité.
3. ALPHADIA sa/nv et ses distributeurs autorisés ne peuvent pas être tenus responsables des dommages occasionnés indirectement ou consécutivement à un changement ou une modification dans le procédé indiqué. L'utilisation de cette trousse est réservée uniquement à un personnel technique qualifié.
4. L'utilisation de cette trousse est soumise au respect des Bonnes Pratiques de Laboratoires « BPL » et doit également tenir compte de tous les règlements généraux et spécifiques liés à l'utilisation d'une telle trousse.
5. La responsabilité d'ALPHADIA sa/nv se limite dans tous les cas au remplacement de la trousse.

GARANTIE
ALPHADIA sa/nv décline toute responsabilité vis-à-vis des dommages directs, indirects ou conséquents résultant de l'usage inadéquat des réactifs inclus dans cette trousse.

Fabriqué par
ALPHADIA sa/nv
Avenue Vésale 26 1300 Wavre BELGIQUE
Tel : 0032 (0) 10 24 26 49 Fax : 0032 (0) 10 24 55 99
Email : contact@alphadia.be
www.alphadia.be